

ZUR LIPIDEXTRAKTION AUS DER LEBER

Adam Alfred

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0081

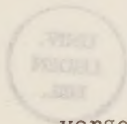
AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Spann

ZUR LIPIDEXTRAKTION AUS DER LEBER

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Adam Alfred
aus München

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E.Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W.Spann

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1979



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Lipidextraktionsmethoden nach literaturangaben	2
2.1 Definition der Begriffe "Lipide" und "Fette"	2
2.2 Extraktionsmethoden	3
2.2.1 Wesen der Extraktion	3
2.2.2 Problematik der Lipidextraktion aus Geweben	3
3. Eigene Untersuchungen	10
3.1 Beschreibung der Extraktionsmethode	10
3.1.1 Arbeitsvorschrift	10
3.1.2 Erläuterung der Arbeits- vorschrift	10
3.2 Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	13
3.3 Vergleich zwischen Chloroform- Methanol- und n-Hexan-Extraktion	16

2.4. Nachkontrasttechnische Darstellung	19
des Fettstrukturens der Lebertumoren	
2.5. Gegenüberstellung der makroskopischen,	20
histologischen und chemischen Ver-	
fettungsgradbestimmung	
2.5.1 Beschreibung des Materials	20
2.5.2 Lipidverteilung in der Leber	21
2.5.3 Chemischer Verfettungsgrad in	21
Abhängigkeit von makroskopi-	
schem Lebertumorstadium	
2.5.4 Chemischer Verfettungsgrad in	22
Abhängigkeit von mikroskopi-	
schem Lebertumorstadium	
2.5.5 Korrelationsbeziehungen zwischen	22
histologischen und chemischen	
Ergebnissen	
3. Zusammenfassung	23
4. Literaturverzeichnis	24

1. Einleitung

Zur Extraktion von Lipiden aus tierischen und pflanzlichen Geweben ist eine Reihe von Verfahren in Gebrauch, deren Vor- und Nachteile seit langem bekannt sind. Eine mit Hilfe dieser Verfahren rasch und ohne apparativen Aufwand durchzuführende sowie die Beimengung von Nichtlipidbestandteilen vermeidende Gesamtlipidbestimmung scheint gleichwohl auf große Schwierigkeiten zu stoßen.

Die vorliegende Arbeit stellt eine einfache Chloroform-Methanol-Extraktionsmethode vor, deren Eignung für eine Schnellbestimmung der menschlichen Leberlipide geprüft werden soll. Gerade an der Leber kann ein objektiver chemisch-quantitativer Lipidnachweis, wenn nicht einen Ersatz, so doch zumindest eine sinnvolle Ergänzung der üblichen subjektiven histologischen Schätzung des Verfettungsgrades darstellen. Dies zeigt ein Vergleich der beiden Methoden. Darüber hinaus ist eine vollständige und Verunreinigungen weitgehend ausschließende Lipidextraktion von großer Wichtigkeit für eine etwaige qualitative Untersuchung der Leberlipide, die gerade in der letzten Zeit zunehmendes Interesse gefunden hat.

2. Lipidextraktionsmethoden nach Literaturangaben

2.1 Definition der Begriffe "Lipide" und "Fette"

Mit dem Begriff "Lipide" wird im allgemeinen eine Stoffklasse bezeichnet, die ubiquitär im Tier- und Pflanzenreich verbreitet ist, deren Untergruppen in ihrer chemischen Struktur aber sehr entfernte Verwandtschaft aufweisen. Ihr gemeinsames chemisches Merkmal ist lediglich der Besitz lipophiler Gruppen, was eine gute Löslichkeit in sogenannten Fettlösungsmitteln wie z. B. Äther, Benzol, Chloroform, Petroleum, andererseits jedoch Unlöslichkeit in Wasser bedingt (BUDECKE, 6).

Einige Autoren (CHRISTEN, 8; CHAPMAN, 7) betonen besonders die tatsächliche oder potentielle Abstammung der Lipidmoleküle von Fettsäuren oder anderen näher verwandten Substanzen. Diese Definition führt zwar zum Ausschluß von Terpenen und Steroiden, nicht aber von deren Fettsäureestern.

Wegen der häufigen Gleichsetzung der Begriffe Fette und Lipide sei auch auf die eigentliche Definition des Fettes hingewiesen: Unter Fett versteht man im chemischen Sinn eine bestimmte Klasse der Lipide - die Triglyceride, d. h. die Glycerinester von Carbonsäuren mit 12 bis 20 C-Atomen (CHRISTEN, 8).

2.2. Extraktionsmethoden

2.2.1. Wesen der Extraktion

Aufgrund der Löslichkeit der Lipide in den "Fettlösungsmitteln" wurden schon früh zahlreiche Extraktionsmethoden entwickelt, mit deren Hilfe es möglich war, die Lipide von anderen chemischen Verbindungen abzutrennen. Alle diese Verfahren gehen letztlich auf den nach NERNST benannten Verteilungssatz zurück, der zwei Aussagen beinhaltet (HECKER, 23).

1. Eine gelöste Substanz, die sich im Gleichgewicht mit zwei beschränkt mischbaren Phasen befindet, ist in einem konstanten und reproduzierbaren Verhältnis zwischen diesen Phasen verteilt. Das Verteilungsverhältnis hängt im Idealfall außer vom Lösungsmittelsystem nur von der Temperatur (und vom Druck), nicht aber von der Konzentration der gelösten Substanz ab.
2. Bei Gegenwart mehrerer Molekelarten in beiden Phasen verteilen sich die Molekel so, als wären die anderen nicht zugegen.

2.2.2. Problematik der Lipidextraktion aus Geweben

Die Extraktion der Lipide aus biologischen Geweben wird allerdings durch eine Reihe von Faktoren erschwert. So führt CHAPMAN (7) folgendes an:

1. Einige Lipide bilden mit Proteinen oder Kohlenhydraten Komplexe, die in den üblichen Fettlösungsmitteln unlöslich sind,

2. einige Lipide lösen sich nur in begrenztem Umfang in diesen Lösungsmitteln,
3. einige nicht aus Lipiden bestehende Gewebekomponenten werden ebenfalls durch diese Lösungsmittel gelöst.

Eine weitere Komplikation besteht nach LOVERN (35) darin, daß ansonsten gute Lösungsmittel sich am nassen Gewebe als nicht effizient erweisen und das Gewebe erst getrocknet werden muß.

Gewöhnlich bereitet die Extraktion von Triglyceriden keine Schwierigkeiten, weil Triglyceride nicht an Lipoprotein- oder Glykolipid-Komplexe gebunden und in Fettlösungsmitteln leicht löslich sind. Das gleiche trifft für Wachse zu. Phospholipide, Sphingolipide und polare Lipide liegen dagegen normalerweise in gebundener Form vor. Es ist seit langem bekannt, daß Alkohol viele dieser proteingebundenen Lipide freisetzen kann, obwohl er sonst (z. B. für die Cephalin-Gruppe) kein gutes Extraktionsmittel darstellt.

Die Vorteile des Alkohols konnten KUMAGAWA und SUTO, 1908 (33), in einem Vergleich der damals üblichen Extraktionsmethoden - vor allem abwechselnde Extraktion mit Alkohol, Chloroform, Aceton, Petroleum und Äther - bestätigen. Indessen konnte BLOOR, 1914 (4), zum ersten Mal beobachten, daß die Lösungsstärke von Alkohol wesentlich gesteigert werden kann, wenn er in einer Mischung von Äther verwendet wird. Seine 3 : 1 Äthanol-Äther-Kombination wurde in der folgenden Zeit mit nur geringen

Veränderungen von den meisten Forschern übernommen. 1936 gelang es BOYD (5) festzustellen, daß das Verhältnis Äthanol-Äther in einem weiten Bereich beliebig verändert werden kann, ohne die Ergebnisse wesentlich zu beeinflussen. Im gleichen Jahr entdeckten THANNHAUSER und SETZ (47) die Vorzüge einer Chloroform-Methanol-Mischung im Verhältnis 1 : 1. Sie arbeiteten an getrocknetem Gewebe aus Milz, Leber und Gehirn, wobei die Lipide 12 Stunden lang heiß extrahiert wurden. In einem Vergleich zwischen Äthanol-Äther und Chloroform-Methanol wurde die prinzipielle Gleichwertigkeit dieser beiden Systeme von ERICKSON (10) und Mitarbeitern 1940 anerkannt. 1941 wiesen HAVEN und LEVY (22) nach, daß bei Anwesenheit von Sphingolipiden die Chloroform-Methanol-Methode die besseren Ergebnisse liefert. Allerdings konnte sie wie auch zahlreiche andere zu spezielleren Zwecken entwickelte Verfahren nicht in zufriedenstellendem Maße mit dem Problem der Verunreinigungen durch Nichtlipide fertig werden (LOVERN)(35). Dieses Problem gründet sich vor allem auf die Tatsache, daß

1. viele Fettlösungsmittel, so z. B. Alkohol, sich an nassen Geweben als ebenso gute Lösungsmittel für Stoffe wie Stickstoffbasen, Zucker, Aminosäuren erweisen,
2. Substanzen, die normalerweise in Fettlösungsmitteln unlöslich sind, in der Gegenwart von Phospholipiden als Phospholipidkomplexe in Lösung gehen können.

Die erste Schwierigkeit läßt sich unter Umständen durch eine nachfolgende Re-Extraktion mit solchen Lösungsmitteln vermeiden, in denen ein Teil der störenden Substanzen unlöslich ist. Die Entfernung von Verunreinigungen, die infolge einer Komplexbildung mit Phospholipiden entstanden sind, wurde unter anderem durch Zugabe von ebenfalls mit Phospholipiden reagierenden Elektrolyten (Magnesiumchlorid, Cadmiumchlorid usw.) versucht. Die Wasserlöslichkeit dieser Verunreinigungen bietet einen weiteren Ansatzpunkt für ihre Beseitigung.

So bearbeitete McLEAN (37) bereits 1914 ein Phospholipidextrakt mit Wasser bzw. einer verdünnten Salzlösung und trennte die Lipide durch Zugabe von Aceton ab. 1948 dialysierte SINCLAIR (44) eine wäßrige Emulsion von Phospholipiden gegen Wasser, während McKIBBIN und TAYLOR (36) eine Chloroformlösung von Lipiden mit einer wäßrigen Lösung von Magnesiumchlorid reinigten, wobei die entstandene Emulsion durch Einfrieren, Auftauen und Zentrifugieren wieder gebrochen wurde.

FOLCH und Mitarbeiter (14) veröffentlichten 1951 eine 2 : 1 Chloroform-Methanol-Methode, die im Vergleich zu den üblichen Chloroform-Methanol-Methoden weniger zeitraubend, unkomplizierter und wegen des Verzichts auf die Verwendung kochender Lösungen gegen den Einwand der Veränderung von einigen Lipiden gewappnet war. Der Lipidextrakt, den die Autoren nach einer Homogenisierung von Hirngewebe mit der Chloroform-

Methanol-Mischung im Verhältnis 20 cmm der Lösung zu 1 g des Gewebes und anschließender Filtration der unlöslichen Bestandteile erhalten hatten, wurde mit einer großen Menge Wasser in Kontakt gebracht, wodurch die Nichtlipide zum größten Teil entfernt wurden. Allerdings mußte man dabei den Verlust von Strandin, Diphosphoinositiden und ca 1% der restlichen Lipide in Kauf nehmen. Den Wascheffekt des Wassers erklärt FOLCH mit der Diffusion des leichteren Methanols in das Wasser, wobei das schwerere und mit Wasser schlecht mischbare Chloroform zusammen mit dem Extrakt in der unteren Phase bleibt. Dieser Effekt hält so lange an, bis das Methanol unter Mitnahme der nichtlipiden Bestandteile vollständig aus dem Extrakt verschwunden ist. Im Gleichgewichtszustand besteht das System aus einer oberen Wasser-Methanol-Phase und einer unteren Chloroform-Lipid-Phase. Dazwischen befindet sich noch eine Phase von FOLCH "fluff" genannt, die aus Proteolipiden und freien Lipiden besteht, welche erst wieder abgetrennt und erneut extrahiert werden müssen. Das im letzten Schritt erfolgende Trocknen des Gesamtextrakts in einem Wasserbad kann zur Schaumbildung führen.

Diese Schwierigkeiten konnte FOLCH durch einen sechs Jahre später publizierten Vorschlag (15) ausschalten. Diesmal verwendete er zum Waschen des Chloroform-Methanol-Extrakts nur eine kleine Menge Wasser (0,2 % des Extrakts) sowie verschiedene Salze. Das Salzwasser-Extrakt-Gemenge wird zentrifugiert, wonach es praktisch keinen "fluff" mehr enthält. Damit gelingt es, auch

Lipidverluste und Verunreinigungen durch Nichtlipide einzuschränken. Den Erfolg dieses Verfahrens führt FOLCH auf die Verwendung der Salze zurück. Als eine mögliche Erklärung für deren Wirkungsweise wird angegeben, daß saure Lipide, die aus dem Gewebe in Form ihrer Na-K-Cl-Mg-Salze extrahiert werden, in der oberen Phase dissoziieren, in der unteren Phase aber lediglich in der undissoziierten Form vorliegen. Die Zugabe größerer Mineralsalzmengen, die die erwähnten Kationen beinhalten, würde den Dissoziierungsgrad durch einen "mass action effect" vermindern mit den notwendigen Folgen der Verschiebung der Lipide in die untere Phase, wobei die Mineralsalze quantitativ in der oberen Phase verbleiben.

Dieses FOLCHSCHE Verfahren wurde nun von zahlreichen Autoren übernommen und hat sich besonders im deutschsprachigen Raum bis in die heutige Zeit bewährt. SCHÖN (43) und Mitarbeiter verwendeten es beispielsweise 1965 zur Untersuchung des Fettsäuremusters der menschlichen Leber; HOLCZABEK (26) benutzte das gleiche Verfahren 1968 bei seinen Lipiduntersuchungen bei Fäulnis und RADKE (39) griff darauf 1975 zurück, anlässlich seiner gaschromatographischen Bestimmung von Lipiden in Blut- und Organgeweben.

1973 wurde indessen von der ISO (The International Organization for Standardization) ein "Extraktionsverfahren zur Gesamtfettbestimmung in Fleisch- und Fleischwaren" vorgeschlagen, welches vor allem in englischsprachigen Ländern große Bedeutung erlangt

hat (ATKINSON) (1) und in seiner ursprünglichen Form auf STOLD/WEIBULL zurückgeht (27). Es beruht auf der Befreiung der an Proteine gebundenen Lipidfraktion mit Hilfe kochender Salzsäure, der Filtration der daraus resultierenden Masse und dem Trocknen und Extrahieren des auf dem Filterpapier verbleibenden Lipides mit Hexan oder leichtem Petroleum in einem Soxhletapparat. Da diese Methode zeitlich (Dauer ca 10 Stunden) und technisch sehr aufwendig ist, konnte sie sich für eine Schnellbestimmung im Labor nicht durchsetzen.

Die Suche nach einer vereinfachten Arbeitsweise nahmen unter anderen ATKINSON, 1972 (1), und HALLERMAYER, 1976 (18), auf. Beide schlugen ein 1 : 1 Chloroform-Methanol-System vor, wobei das ATKINSONsche Verfahren sich aufgrund seines großen technischen Aufwandes als nachteilig erwies. Die Methode von HALLERMEIER wurde unseres Wissens bisher nur in der Lebensmittelchemie an Fleisch und Fleischwaren erprobt und fand in der medizinischen Forschung noch keine Verwendung. In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls eine 1 : 1 Chloroform-Methanol-Extraktionsmethode vorgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, in einem vertretbaren Zeitraum und ohne apparative Schwierigkeiten eine Gesamtlipidbestimmung im Lebergewebe vorzunehmen.

3. Eigene Untersuchung

3.1. Beschreibung der Extraktionsmethode

3.1.1. Arbeitsvorschrift

In einem Glasgefäß werden 20 g Lebergewebe mit 20 g Wasser am Ultra-Turrax homogenisiert, aus dem Homogenisat 5 g in ein 200 ml Zentrifugenglas gewogen und dreimal mit je 35 ml Chloroform-Methanol 1 : 1 (v : v) homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Extrakte sammelt man in einem Scheidetrichter. Die Phasentrennung wird mit 25 ml eine 0,9 %igen NaCl-Lösung erreicht. Nach Abtrennung der lipidhaltigen Unterphase engt man diese in einer Abdampfschale schonend durch Trocknen ein. Der prozentuale Fettgehalt errechnet sich aus:

$$\frac{S(B) - S(T)}{100} \times \frac{H}{2} = \% \text{ Fett}$$

S(B) = Bruttogewicht der Abdampfschale mit dem
Lipidextrakt

S(T) = Taragewicht der Schale

H = Homogenisateinwaage

3.1.2. Erläuterung der Arbeitsvorschrift

Das zu extrahierende Gewebe wird nicht sofort im Ultra-Turrax zerkleinert, sondern erst mit destilliertem Wasser im Gewichtsverhältnis 1 : 1 in einem dickwandigen Gefäß zusammengebracht. Die Wasserzugabe garantiert eine bessere Durchmischung der

Probe und verringert eventuelle Verluste an dem Homogenisator. Um einen zuverlässigen Querschnitt über den Lipidgehalt der Leber zu bekommen, empfiehlt es sich, ein größeres Gewebsstück (z. B. 20 g) zu verwenden, welches sorgfältig von den Resten der Bindegewebskapsel befreit sein muß. Es konnte nachgewiesen werden (3.5.2.), daß es im Grunde gleichgültig ist, aus welchem Leberteil die Probe entnommen wird, da die Lipidverteilung in der Leber nur geringen und unsystematischen Schwankungen unterliegt.

Anschließend erfolgt eine vollständige Homogenisierung des Gewebe-Wasser-Gemisches mit Hilfe des Ultraturrax. Aus dem Homogenisat werden ca 5 g (genau abgewogen), d. h. 2,5 g Lebergewebe, in ein 200 ml-Zentrifugenglas überführt und mit 35 ml Chloroform-Methanol 1 : 1 (v : v) aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung wird erneut homogenisiert und danach 10 Minuten bei 2500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Den klaren Überstand bringt man in einen einfachen 250 ml-Scheidetrichter. Das feste Sediment hingegen wird noch zweimal der Extraktion mit Chloroform-Methanol unterworfen, der Überstand beide Male im gleichen Scheidetrichter gesammelt. Eine vierte Extraktion fördert, wie gezeigt werden konnte, keine Lipide mehr.

Nach insgesamt dreimaliger Extraktion also, versetzt man den gesammelten Überstand mit 25 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung. Durch die Verwendung der physiologischen Kochsalzlösung statt der von HALLERMAYER

(18) vorgeschlagenen 0,58 %igen Lösung wird der Elektrolytgehalt erhöht und der Aussalzeffekt (FOLCH) (15) verstärkt. Darüber hinaus ist die einfache Herstellbarkeit und Verfügbarkeit einer solchen Lösung gerade im medizinischen Bereich zu berücksichtigen.

Der Scheidetrichter wird nun mehrmals geschüttelt und für einige Minuten in einem Halter stehen gelassen. Es bilden sich zwei Phasen, eine untere Chloroform-Lipid und eine obere Methanol-Wasser-Phase, von denen die untere in einer tarierten Abdampfschale aufgefangen wird. Dies scheint weniger umständlich zu sein als die mit neuen Fehlerquellen verbundene und besonders konstruierte Scheidetrichter erfordernde Entnahme eines aliquoten Anteils.

Das Chloroform dampft man unter Abzug mehrere Stunden bei Zimmertemperatur ab, was eine schonende Behandlung der Lipide gewährleistet. Als Alternative bietet sich die Abdampfung im Wasserbad bei 60° C an, die nur 40 - 60 Minuten erfordert.

Die Schale mit dem verbleibenden Lipidextrakt wird gewogen. Aus dem errechneten Brutto-Tara-Differenzbetrag läßt sich das Lipidgewicht berechnen und in bezug zur Einwaage von 2,5 g setzen. Es resultiert daraus der prozentuale Lipidgewichtsanteil der Probe.

3.2. Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um die Chloroform-Methanol-Extraktionsmethode auf ihre Reproduzierbarkeit hin zu prüfen, wurde ein 50 g schweres Leberstück mit 50 g destilliertem Wasser versetzt und mechanisch zerkleinert. Dem Homogenisat wurden 10 Proben à 5 g entnommen und, wie oben beschrieben, verarbeitet. Zur Kontrolle wurde dieser Vorgang an einer zweiten Leber wiederholt.

Die Resultate in Form der Lipidgewichte in g führt Tabelle 1 auf.

Abbildung 1 repräsentiert das Streuungsdiagramm der Einzelwerte, die ausnahmslos im $\pm 2s$ Bereich liegen. Die Standardabweichung s , der Mittelwert $\bar{x}$ und der Variationskoeffizient VK (berechnet nach SACHS) (40) betragen im einzelnen:

Probe 1: $\bar{x} = 0,3086 \text{ g}$
 $s = 0,0062$
 VK = 2 %

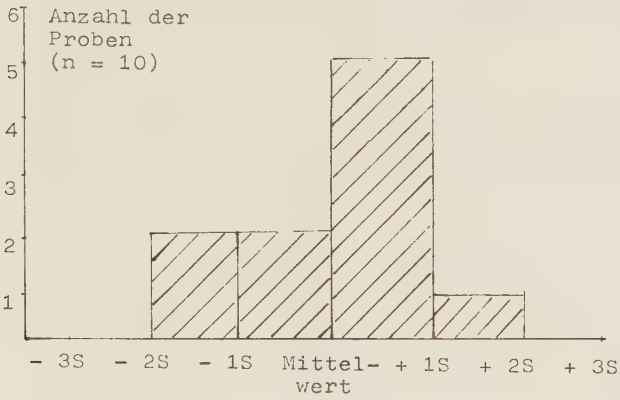
Probe 2: $\bar{x} = 0,6312 \text{ g}$
 $s = 0,0098$
 VK = 1,5 %

Tabelle 1: Lipidanteile in g und in % der eingewogenen
2,5 g schweren Leberproben

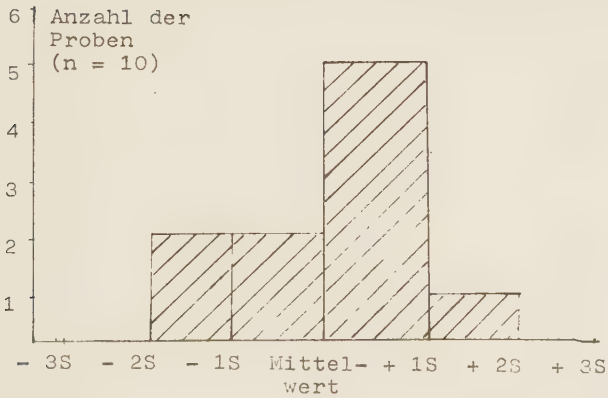
Leber 1:		Leber 2:	
g	%	g	%
Probe 1. 0,3094	12,37	0,6405	25,62
2. 0,3119	12,47	0,6462	25,84
3. 0,3179	12,71	0,6392	25,56
4. 0,2981	11,92	0,6271	25,08
5. 0,2998	11,99	0,6134	24,53
6. 0,3134	12,53	0,6327	25,30
7. 0,3040	12,16	0,6281	25,12
8. 0,3100	12,40	0,6322	25,28
9. 0,3122	12,48	0,6350	25,40
10. 0,3096	12,38	0,6177	24,70

Abbildung 1: Streuungsdiagramm der Werte aus Tabelle 1

(a) Leber 1



(b) Leber 2



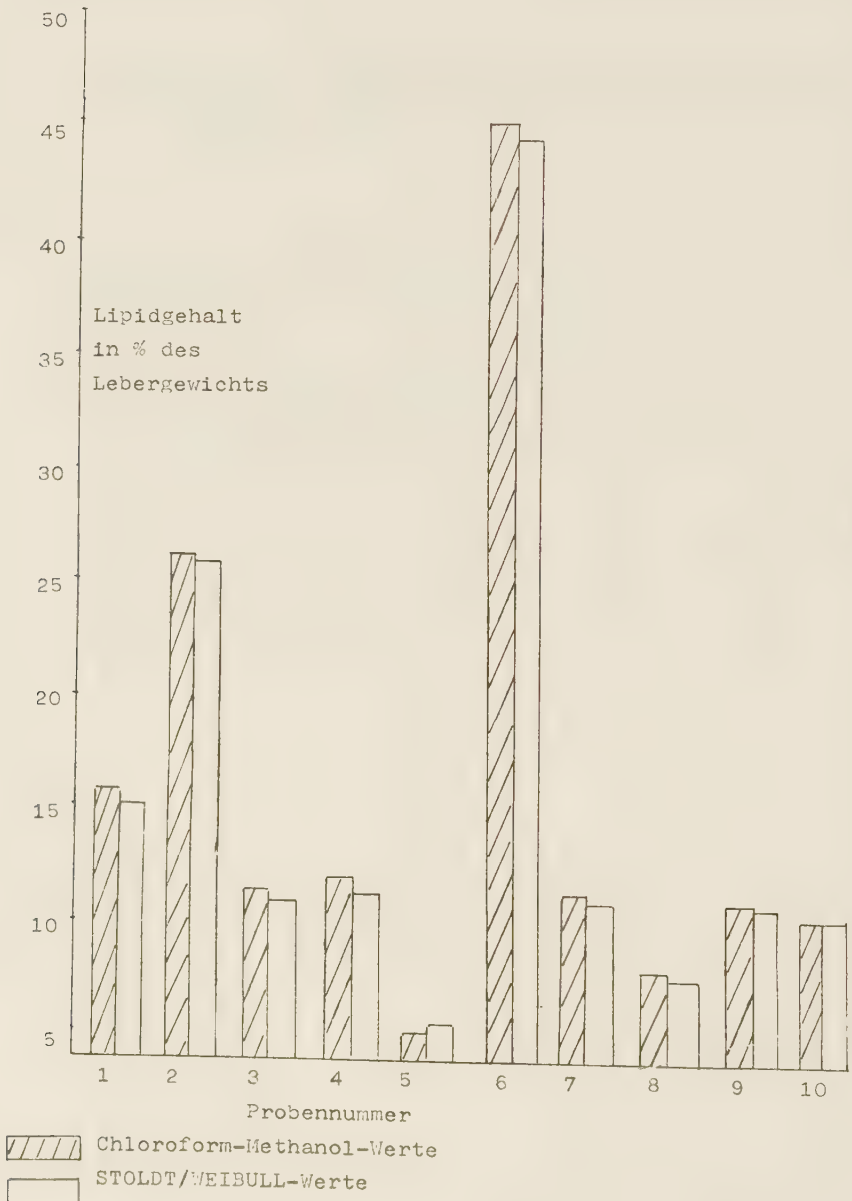
3.3. Vergleich zwischen Chloroform-Methanol- und n-Hexan-Extraktion

Die Überprüfung der Objektivität des Chloroform-Methanol-Verfahrens geschah durch eine Gegenüberstellung mit der n-Hexan-Gesamtlipidextraktion nach STOLDT/WEIBULL unter den Bedingungen der "International Organization for Standardisation" (27). Zu diesem Zweck wendeten wir beide Methoden auf 5 g-Proben aus jeweils gleichem Ausgangshomogenisat von 10 verschiedenen Lebern an (s. Tabelle 2, Abbildung 2). Die relativen Lipidgehalte wurden nach WILCOXIN (SACHS) (40) statistisch getestet. Auf dem $\alpha = 5\%$ -Niveau und bei zweiseitiger Testung bestand danach trotz einer Tendenz zu geringfügig höheren Werten beim Chloroform-Methanol-System kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Verfahren.

Tabelle 2: Vergleich der mit Chloroform-Methanol und
n-Hexan bestimmten Lipidgehalte

Lebernummer	Lipidgehalt in % des Lebergewichts nach	
	Chloroform-Methanol	STOLDT/WEIBULL
1.	15,22	14,99
2.	25,73	25,22
3.	12,36	11,96
4.	12,41	11,16
5.	3,82	4,3
6.	43,49	42,01
7.	11,56	11,44
8.	7,25	6,98
9.	9,77	9,77
10.	8,02	8,03

Abbildung 2: Vergleich der mit Chloroform-Methanol und
n-Hexan bestimmten Lipidgehalte



3.4. Gaschromatographische Darstellung des Fettsäure- musters der Leberlipide

Einen Hinweis auf die qualitative Eignung der Chloroform-Methanol-Methode für die Leberlipidextraktion liefert die gaschromatographische Lipidanalyse, die wir nach der Aufarbeitung und Methylierung des erhaltenen Gesamtlipidextrakts nach HADORN (17) vornahmen. Die gaschromatographische Auftrennung fand unter den unten angegebenen Bedingungen statt:

Gerät: PYE Gaschromatograph 104

Detektor: FID

Säule: 10 % Alltech CS5 auf 100/120 Chromosorb W - AW
Länge 2 m; Innendurchmesser 2 mm

Temperatur: 200 C isotherm

Trärgas: He; Strömung 40 ml/min.

Retentionszeiten

Palmitin: 11,75 min

Palmitoleinsäure: 13,37 min

Stearin: 22,12 min

Ölsäure: 24,50 min

Linolsäure: 28,62 min

Arachidonsäure: 60,12 min

(Vergleichsdaten der Firma Serva - Heidelberg)

Insgesamt untersuchten wir acht Leberproben unterschiedlichen Lipidgehalts unter der Voraussetzung, daß zwischen dem Todes- und Sektionszeitpunkt nicht mehr als 48 Std. vergangen sein durften. Diese Bedingung mußte gestellt werden, um postmortale,

qualitative Lipidveränderungen möglichst gering zu halten. Weiterhin durften keine Speicherkrankheiten bzw. Cirrhosen im Untersuchungsmaterial vorkommen.

In der Tabelle 3 (a) finden sich die relativen Flächenanteile der einzelnen Fettsäurespeaks, gegliedert nach gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und in Abhängigkeit vom chemisch bestimmten Lipidgehalt der Proben. Die Flächenberechnung erfolgte in Anlehnung an GNAUCK (16) nach Peakhöhe $\times$ Breite in halber Höhe ($H \times \frac{b}{2}$). Tabelle 3 (b) zeigt zum Vergleich die von BERG (2) an klinischen Leberpunktaten bestimmten Flächenwerte, die er mit histologischem Verfettungsgrad korrelierte. Seine Untersuchungen wurden getrennt nach der Phosphatid-, Triglycerid- und Cholesterinesterfraktion des Gesamtlipidextrakts durchgeführt. In allen drei Fraktionen ergaben sich hierbei ähnliche Fettsäuremethylester-Chromatogramme.

In Übereinstimmung mit BERG (2) und auch mit anderen Autoren (SCHÖN) (4), (GNAUCK) (16) stellten wir folgende relative Veränderungen des Fettsäuremusters fest:

1. Mit steigender Leberverfettung nehmen die gesättigten Fettsäuren, repräsentiert durch die Stearin- und Palmitinsäure, ab.
2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, vor allem die Arachidon- und Linolsäure, sinken ebenfalls.

3. Einfach ungesättigte Fettsäuren, hauptsächlich Ölsäure, steigen mit zunehmender Verfettung.

Abbildung 3 zeigt die Fettsäure-Methylester-Gas-chromatogramme einer chemisch kaum und einer chemisch stark verfetteten Leber.

Tabelle 3 (a): Relativer Flächenanteil (%) der Fettsäure-Methylester im Gaschromatogramm in Abhängigkeit vom chemischen Verfettungsgrad

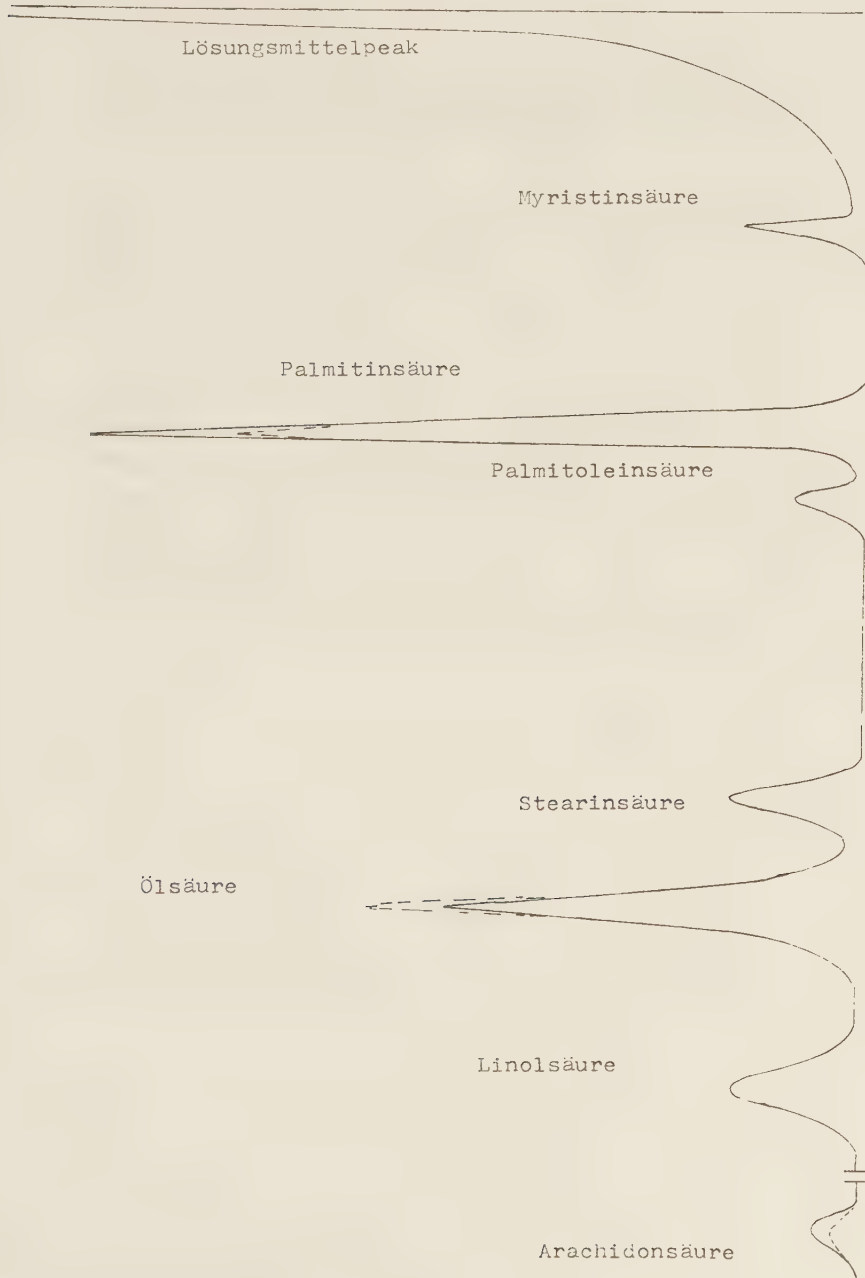
Peakfläche in %			
Gesamtlipid- gehalt der Leber in % des Leber- gewichts	Palmitin + Stearin	Ölsäure + Palmitolein- säure	Linolsäure + Arachidon- säure
4,25	59	24	16
6,69	55	30,4	14,4
7,23	47,7	38,8	13,4
9,92	49,5	37,1	13,3
12,64	46,4	39,2	14,3
13,32	49,1	38,9	11,8

Tabelle 3 (b): Mittelwerte der gesättigten, einfach
Nach BERG (2) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren
der Neutrallipoide bei geringerer
Leberepithelverfettung und Fettleber
im Vergleich zu Normalbefunden

	Gesättigte	Monoen	Polyen-Fett- säuren
Normale	52,1	36,5	11,4
geringe Le- berverfet- tung	48,4	42,8	8,8
Fettleber	47,5	44,2	8,3

Abbildung 3: Gaschromatographische Darstellung von
Fettsäure-Methylestern des Gesamtlipid-
extrakts aus der Leber

— chemisch wenig verfettete Leber
---- chemisch stärker verfettete Leber



3.5. Gegenüberstellung der makroskopischen, histologischen und chemischen Verfettungsgradbestimmung

3.5.1. Beschreibung des Materials

Nach der beschriebenen Arbeitsvorschrift untersuchten wir in den Jahren 1977/78 114 Lebern aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München. Hierzu wurden die laufend anlässlich der Sektionen aus dem rechten Leberlappen gewonnenen ca 100 g schweren Leberstücke bis zu ihrer Aufbereitung in Plastikbeuteln bei -20°C gelagert. Laut CHAPMANN (7) soll in diesem Temperaturbereich die Lipidzusammensetzung auf Wochen bis Monate konstant bleiben. Durch eigene Beobachtungen konnte außerdem gesichert werden, daß dabei nur unwesentliche Flüssigkeitsverluste auftreten, so daß mit einer relativen Zunahme des Lipidanteils praktisch nicht zu rechnen ist.

Bei der Auswahl der Präparate wurde auf folgende Kriterien geachtet:

1. Hinsichtlich der Todesursachen und des Geschlechts wurde keine Auswahl getroffen - insgesamt wurden 30 Lebern von weiblichen und 84 Lebern von männlichen Leichen untersucht, die Todesursachen reichten von "zentralen Lähmungen bei Hirnverletzung" über "Herz-Kreislauf-Versagen bei Lungenentzündung" bis "Herzversagen bei Herzdurchschuß"

2. Das Alter der Verstorbenen sollte höher als 12 Jahre sein, da bei Kindern eventuelle Abweichungen des Lipidgehalts von der Erwachsenennorm vorkommen könnten (KETTLER) (29).
3. Ca 1/3 der Lebern durfte makroskopisch nicht verfettet sein; die restlichen 2/3 konnten dafür Verfettungszeichen verschiedenen Grades aufweisen, Fettcirrhose (9 Fälle) eingeschlossen.
4. Stark auto- bzw. heterolytisch veränderte Lebern wurden nachträglich ausgeschlossen. So mußten wir auf die Berücksichtigung von 8 Lebern verzichten, bei denen zwar der chemische Lipidgehalt hätte bestimmt werden können, die histologische Befundung dagegen nicht möglich war.

Im übrigen wurden keine weiteren Einschränkungen vorgenommen.

Tabelle 4 faßt die wichtigsten Daten zusammen.

Tabelle 4: Aufstellung des Versuchsmaterials, geordnet nach Alter, Geschlecht und makroskopischem Verfettungszustand der Leber

Lebernummer	Alter	Geschlecht männlich = m weiblich = w	makroskopisch ver- fettet = + makroskopisch nor- mal = -
1.	43	m	+
2.	36	m	+
3.	30	m	+
4.	40	m	+
5.	69	w	+
6.	36	m	+
7.	50	m	+
8.	22	w	+
9.	55	w	+
10.	66	m	+
11.	24	w	+
12.	-	m	-
13.	37	m	+
14.	63	m	+
15.	60	w	+
16.	49	m	+
17.	17	m	-
18.	50	m	+
19.	51	w	+
20.	67	m	+
21.	30	m	-
22.	54	m	+

Lebernummer	Alter	Geschlecht männlich = m weiblich = w	makroskopisch ver- fettet = + makroskopisch nor- mal = -
23.	72	w	+
24.	80	m	+
25.	53	m	+
26.	49	m	+
27.	34	w	+
28.	70	m	-
29.	-	w	+
30.	70	m	+
31.	12	m	-
32.	43	m	-
33.	52	w	+
34.	51	m	-
35.	41	w	-
36.	43	w	-
37.	50	m	+
38.	37	w	-
39.	47	m	+
40.	73	m	-
41.	46	m	+
42.	38	m	+
43.	54	m	-
44.	54	w	+
45.	73	m	+
46.	65	w	+
47.	38	m	+
48.	74	m	+

Lebernummer	Alter	Geschlecht männlich = m weiblich = w	makroskopisch ver fettet = + makroskopisch nor mal = -
49.	56	w	+
50.	38	m	+
51.	44	m	+
52.	25	m	+
53.	58	w	+
54.	75	m	+
55.	30	m	+
56.	64	m	+
57.	72	m	-
58.	88	w	-
59.	59	w	-
60.	46	m	-
61.	33	m	+
62.	42	m	+
63.	12	m	+
64.	34	m	-
65.	21	m	-
66.	77	w	+
67.	27	m	+
68.	37	m	+
69.	60	m	+
70.	47	m	+
71.	74	m	+
72.	39	m	+
73.	52	m	+
74.	41	m	+

Lebernummer	Alter	Geschlecht männlich = m weiblich = w	makroskopisch ver- fettet = + makroskopisch nor- mal = -
75.	57	m	+
76.	50	m	+
77.	52	m	+
78.	56	m	+
79.	81	m	+
80.	50	m	+
81.	30	m	+
82.	61	m	+
83.	69	m	+
84.	35	m	+
85.	34	w	-
86.	42	m	-
87.	83	w	-
88.	34	m	+
89.	28	m	+
90.	33	m	-
91.	53	m	-
92.	40	m	-
93.	82	w	-
94.	56	w	-
95.	37	w	-
96.	31	m	-
97.	49	m	-
98.	71	w	-
99.	69	w	-
100.	53	m	-

Lebernummer	Alter	Geschlecht		makroskopisch ver- fettet = + makroskopisch nor- mal = -
		männlich = m	weiblich = w	
101.	24	w		-
102.	25	m		-
103.	24	m		-
104.	48	m		+
105.	30	m		+
106.	38	m		+
107.	37	m		+
108.	28	m		-
109.	29	m		+
110.	23	w		-
111.	34	w		-
112.	58	w		-
113.	12	w		-
114.	26	m		-

3.5.2. Lipidverteilung in der Leber

Das Problem der Lipidverteilung in der Leber wird nach Literaturangaben nur unzureichend behandelt. Anhaltspunkte für eine von der angenommenen gleichmäßigen Verfettung abweichende Lipidlokalisation kommen kaum vor.

HELLY (24) berichtet über fettgelbe Flecken an Autopsielebern, bei denen es sich nur um ein stärkeres Hervortreten einer über das ganze Organ ausgebreiteten Verfettung handelt. Diese Erscheinung wird dadurch begünstigt, daß an solchen Stellen der Blutgehalt des Gewebes bedeutend herabgesetzt ist, was vor allem bei Sepsis auftritt.

FALK (12) beobachtete am vorderen Rand der Leber zu beiden Seiten des ligamentum falciforme hellere Flecken, die einer manchmal vorkommenden Verfettung der Leberzellen in einem auf dem Durchschnitt rundlich oder keilförmig begrenzten Gebiet entsprachen. HAMPERL (21) hat für diese Herde die Bezeichnung Fettinfarkt vorgeschlagen. Dieser Infarkt soll relativ oft vorkommen (10 % aller Obduktionen) und besonders häufig bei plötzlichen zentralen Todesfällen zu finden sein.

Eigenartige Fettknoten, umschriebener Verfettung größerer Leberbezirke gleichend, konnte EUFFINGER (11) feststellen. Er faßte sie als Reste einer ehemals schweren allgemeinen Fettleber auf. Bei teilweisem Schwund des Fettes aus einer Fettleber kommt

es zum Bild dieser "abgemagerten Fettleber", das durch Unebenheiten der Oberfläche, Felderung der Schnittfläche, Einsinken der Stellen des Fettschwundes charakterisiert ist, jedoch keine cirrhotischen Veränderungen aufweist.

THALER (46) führt an, daß bei der Untersuchung von Leberpunktionszylindern an Leichenlebern der chemische Fettgehalt im rechten Leberlappen sich als sehr homogen erweist, während die Fettablagerung im linken Leberlappen weniger einheitlich ist.

KREMER (36) kommt hingegen zu dem Ergebnis, daß innerhalb der Lebern, was den Triglyceridgehalt betrifft, Unterschiede von Punktionsstelle zu Punktionsstelle bestehen. Die Standardabweichung kann bis zu 30 % des Mittelwertes betragen. Den Triglyceridgehalt als Bezugspunkt für die Gesamtlipidabweichungen zu betrachten, scheint hierbei insofern berechtigt zu sein, da bekannt ist, daß die Triglyceride die Hauptlipidfraktion bei Leberverfettung bilden (KREMER) (30).

Die festgestellten regionalen Unterschiede sind nicht systematisch verteilt. Bei der Prüfung der Mittelwerte des rechten und linken Leberlappens läßt sich ebenfalls keine auffällige Differenz in der Höhe der Lipidwerte nachweisen. Allerdings soll eine gewisse Tendenz zu häufigerem Auftreten niedrigerer Werte im linken Leberlappen erkennbar sein.

Laut ELSTER (9), der sich mit dem histologischen Fettverteilungsmuster beschäftigt, zeigen die meisten Lebern ein gleichmäßiges Bild. Nur selten bestehen geringgradige örtliche Unterschiede im Intensitätsgrad der Verfettung wie auch im Verfettungsmuster. Erhebliche Unterschiede beider Kriterien ergeben sich im wesentlichen nur dann, wenn ein Strukturumbau des Parenchyms vorliegt (Cirrhosen, Fibrosen, Tumoren). Unterschiede im Intensitätsgrad der Verfettung zwischen rechtem und linkem Leberlappen können sich bei Stauungslebern finden. In kapsel- und hilusnahen Bezirken können umschriebene, jedoch stets kleine, scharf abgesetzte Parenchyminseln verfettet sein, ohne daß das übrige Parenchym Hinweise auf die Pathogenese gibt.

Angesichts dieser zum Teil widersprüchlichen Befunde erschien es sinnvoll, die Frage der vermutlichen Abweichungen in der Lipidverteilung und ihre Bedeutung für die von uns gewählte Lipidbestimmungsmethode durch eigene Versuche zu klären. Von 3 Lebern wurden je 10 über die Leberlappen wahllos verteilte 20 g-Proben hinsichtlich ihres chemischen Lipidgehaltes untersucht.

Wie Tabelle 5 und Abbildung 4 zeigen, betrugen die regionalen Unterschiede, ausgedrückt durch die Variationskoeffizienten 6,4; 6,9 bzw. 8,2 %; der 8,2 % Höchstwert stammte von einer fettcirrhotisch veränderten Leber.

Die Ursache für die im Vergleich zu KREMERS Angaben (32) geringeren Differenzen ist wohl in der Probengröße zu suchen. Während die Punktionszylinder nur 10 - 15 mg wiegen, sind unsere Versuchsproben ca 1300 - 2000mal schwerer und erfassen auf diese Weise einen wesentlich größeren Leberbereich. Indessen läßt der Bezug der Lipidbestimmung auf das Trockengewicht der Proben eine weitere Verringerung der Differenzbeträge erwarten, da diese Maßnahme den Einfluß agonaler Zirkulationsstörungen bzw. vorbestehender Stauungszustände herabsetzt, somit auch die Blut- bzw. Flüssigkeitsmengenunterschiede innerhalb der Leber im wesentlichen ausgleicht.

Andererseits wäre selbst bei Ausschluß des Flüssigkeitseinflusses keine Sicherheit gegeben, daß das spezifische Lebergewicht in jedem Abschnitt als konstant zu gelten hat, da an unterschiedliche Bindegewebeseinlagerungen - nicht nur bei Fettcirrhose - gedacht werden müßte. Soweit es uns bekannt ist, gibt es darüber noch keine Untersuchungen.

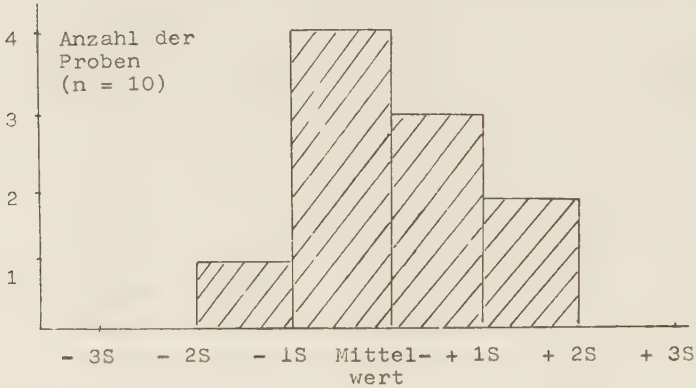
Trotz der beschriebenen Resultate wurde in den folgenden Bestimmungen des histologischen und chemischen Lipidgehaltes immer der laterale Rand des rechten Leberlappens verwendet. Dies sollte einer Standardisierung der Vorgehensweise Rechnung tragen. Es bleibt anzufügen, daß grobmorphologische Besonderheiten in unserem Material nicht beobachtet wurden.

Tabelle 5: Lipidgehalt in g / 100 g Feuchtgewicht
von Proben aus verschiedenen Leberregionen

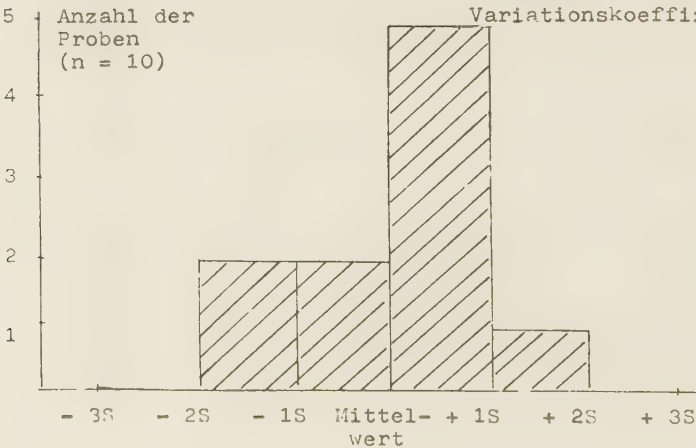
Probennummer	Lipidgehalt im	
	rechten Leberlappen	linken Leberlappen
(a)		
<u>Leber 1</u>		
1.	14,59	13,28
2.	12,44	12,73
3.	12,67	12,90
4.	14,20	14,4
5.	13,43	13,62
(b)		
<u>Leber 2</u>		
1.	5,64	5,24
2.	5,4	4,80
3.	4,94	5,45
4.	5,5	5,95
5.	5,05	5,39
(c)		
<u>Leber 3</u>		
1.	19,43	17,83
2.	16,12	16,28
3.	15,84	17,16
4.	17,76	15,04
5.	15,01	17,36

Abbildung 4: Streuungsdiagramm der Lipidgehalte von Proben aus verschiedenen Leberregionen

(a) Leber 1 Mittelwert = 13,42
 Standardabweichung = 0,76
 Variationskoeffizient = 5,7 %



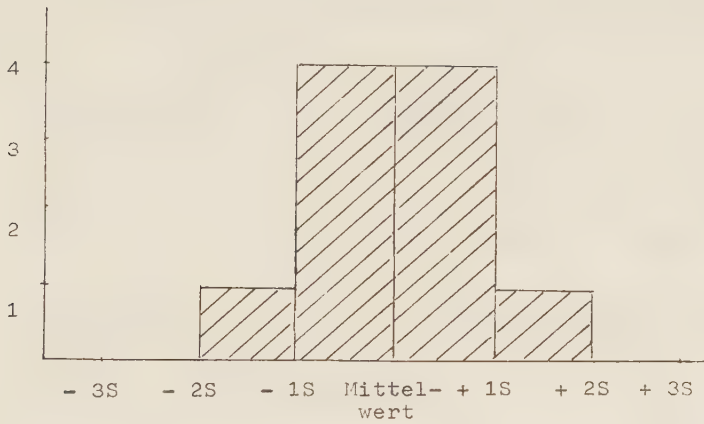
(b) Leber 2 Mittelwert = 5,33
 Standardabweichung = 0,34
 Variationskoeffizient = 6,4 %



(c) Leber 3

Mittelwert = 16,78
Standardabweichung = 1,38
Variationskoeffizient = 8,2 %

Anzahl der
Proben
(n = 10)



3.5.3. Chemischer Verfettungsgrad in Abhängigkeit vom makroskopischen Zustand

Wie bereits erwähnt, bestand das Versuchsmaterial aus 114 Lebern, von denen 40 makroskopisch normal und 74 makroskopisch verfettet waren. Als Zeichen der makroskopischen Verfettung galten dabei in den Sektionsprotokollen beschriebene

- weiche, unelastische, teigige Konsistenz
- auf der Schnittfläche gelbe Farbe, die je nach Blutgehalt und bei Ikterus mit roten und grünen Farbtönen gemischt sein kann
- Organvergrößerung
- spiegelglatte, gespannte Kapsel
- abgerundete Ränder (LAPP) (34)

Untersucht man die Häufigkeitsverteilung des Lipidgehalts bei den beiden Gruppen, so ergeben sich Tabelle 6 und die zugehörige Abbildung 5.

Die makroskopisch normalen Lebern weisen danach einen Lipidgehalt von 3 - 12 % mit deutlichem Maximum im Bereich von 3 - 6 % auf.

Der Lipidgehalt verfetteter Lebern reicht von 3 - 48 %, das Maximum befindet sich bei 12 - 15 %.

Wie aus beiden Diagrammen zu entnehmen ist, kommt es im Bereich von 3 - 12 %, in den ca 40 % der makroskopisch verfetteten Lebern fallen, zur Überschneidung

der makroskopischen Ausschlußdiagnosen. Hier erweist sich die makroskopische Beschreibung für eine kategoriale Zuordnung der Lebern als unzureichend. Ebenso unzureichend sind die Möglichkeiten einer Quantifizierung makroskopischer Befunde. Der in Sektionsprotokollen manchmal unternommene Ansatz einer Einteilung in mäßige Verfettung, extreme Verfettung, Fettleber hängt weitgehend vom subjektiven Eindruck ab und korreliert, soweit überhaupt nachprüfbar, nur grob mit dem tatsächlichen Lipidgehalt.

Das Problem der makroskopischen Abschätzung des Lipidgehaltes in der Leber spielt vor allem in der Laparaskopie eine entscheidende Rolle.

MÜLLER (38) betont die verschiedenen Gewebskomponenten, von denen der Farbeindruck der Leber, auf den es hier besonders ankommt, geprägt wird:

1. Durchblutung
2. Art und Menge interstitieller Flüssigkeit
3. Veränderungen der Leberzellen selbst (Fettvakuolen, Pigmentgehalt, Schwellungen, Nekrosen)
4. Veränderungen des Interstitiums der Leber (zellige Infiltration, Bindegewebsvermehrung, Organumbau)
5. benigne oder maligne Alterationen der Parenchymstruktur

Auch wenn man sich bei der Erhebung der Obduktionsbefunde nicht nur auf den Farbeindruck stützt, sondern zusätzlich andere Maßstäbe berücksichtigt (LAPP) (34), darf nicht übersehen werden, daß der makroskopischen Beurteilung enge Grenzen gesetzt sind. Dies trifft besonders auf die, wie dargestellt wurde, geringgradig verfetteten Lebern zu.

Tabelle 6: Chemisch bestimmter Lipidgehalt von
makroskopisch normalen und verfetteten
Lebern in % des Leberfeuchtgewichtes

(a) makroskopisch normale Lebern

Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt	Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt
12	4,64	87	4,45
17	5,19	90	4,17
21	3,82	91	6,95
28	4,0	92	6,92
31	3,99	93	3,88
32	7,07	94	8,14
34	5,56	95	5,6
35	6,2	96	4,23
36	8,57	97	7,2
38	5,31	98	5,12
40	9,63	99	5,55
43	4,95	100	4,69
57	4,78	101	3,72
58	6,08	102	5,62
59	6,61	103	4,2
60	8,71	108	5,63
64	9,98	110	6,45
65	6,12	111	4,53
85	4,17	112	4,25
86	4,41	113	4,52
		114	6,69

(b) makroskopisch verfettete Lebern

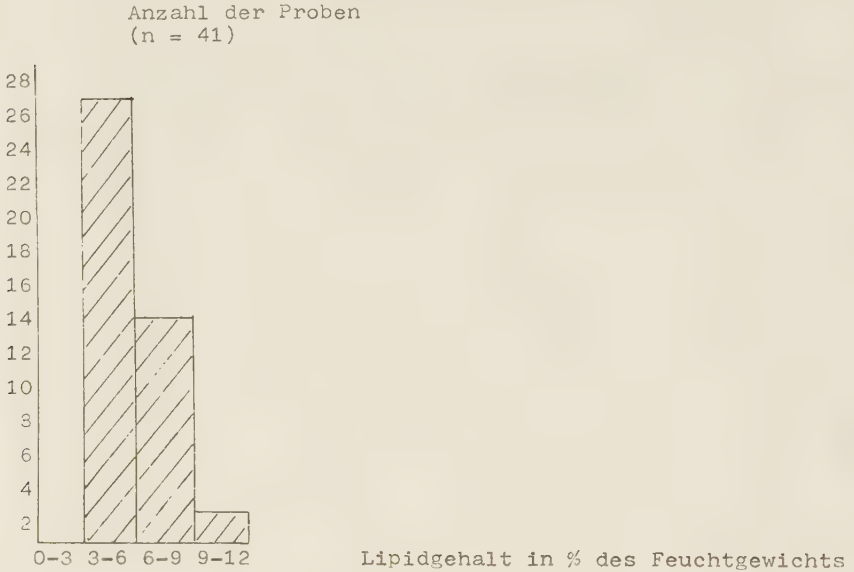
Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt	Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt
1	23,92	33	20,42
2	37,55	37	9,77
3	12,34	41	44,51
4	8,02	42	6,18
5	13,32	44	18,21
6	15,22	45	12,93
7	14,04	46	46,09
8	15,52	47	15,44
9	25,73	48	5,41
10	9,92	49	10,27
11	4,99	50	7,15
13	12,36	51	8,55
14	8,16	52	34,51
15	11,08	53	29,69
16	29,73	54	5,65
18	16,31	55	16,15
19	12,41	56	3,89
20	5,47	61	17,80
22	14,85	62	9,12
23	8,8	63	4,11
24	38,36	66	4,41
25	5,65	67	38,1
26	11,43	68	13,71
27	43,49	69	29,88
29	11,56	70	13,55
30	7,25	71	4,18

(b) makroskopisch verfettete Leber

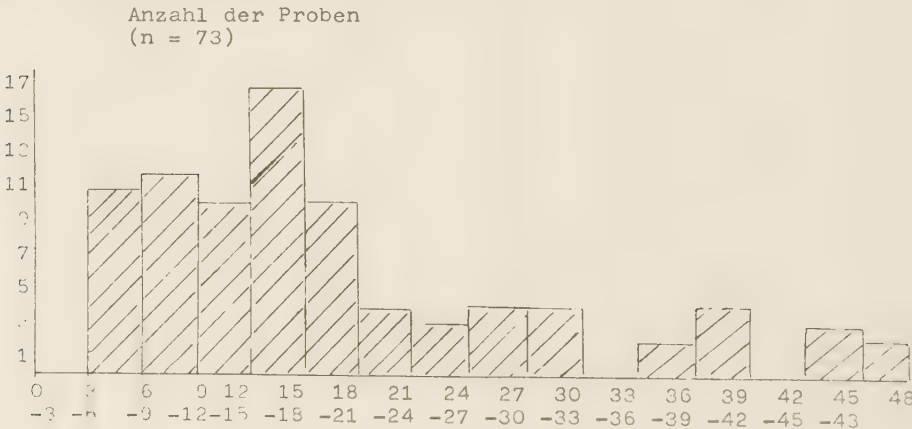
Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt	Leber-Nr.	chem. Lipidgehalt
72	9,61	82	17,66
73	7,38	83	6,87
74	8,17	84	24,71
75	10,10	88	17,03
76	20,11	89	13,2
77	24,41	104	15,34
78	12,38	105	12,64
79	12,38	106	5,69
80	14,01	107	13,18
81	21,92	109	7,23

Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung des chemisch bestimmten Lipidgehalts von makroskopisch normalen und verfetteten Lebern

(a) makroskopisch normale Lebern



(b) makroskopisch verfettete Lebern



3.5.4. Chemischer Verfettungsgrad in Abhängigkeit vom mikroskopischen Leberzustand

Die histologische Klassifizierung nahmen wir aufgrund von Auszählungen des Anteils der verfetteten Leber-epithelzellen im HE-Paraffinschnitt bei 320facher Vergrößerung mit Hilfe eines quadratischen Okularnetzes (Kantenlänge 0,3 mm) der Firma Leitz/Wetzlar vor. Um einen möglichst großen Teil des Präparates zu erfassen, wurde das Präparat, sobald eine Netzfläche vollständig ausgewertet war, nach dem Muster eines Schachbrettes unter dem Objektiv verschoben. Dabei entsprach ein "Schachbrettfeld" der Größe des Okularnetzes. Die im Paraffinschnitt in Form von Vakuolen erscheinenden Fettröpfchen, versuchten wir in modifizierter Anlehnung an SINGER (45) in kleintropfig (bis 10 μ m), mitteltropfig (10 - 30 μ m) und großtropfig (über 30 μ m) einzuteilen, da zusätzlich die Bedeutung der kleintropfigen Verfettungsform untersucht werden sollte. Insgesamt zählten wir pro Präparat 5000 Zellen aus.

Die Abbildungen 6 (a - c) stellen die photographischen Aufnahmen von histologischen Präparaten verschiedener Verfettungsgrade dar. Es handelt sich um die Präparate mit der Nummer 78, 26, 84, die bei 320facher Vergrößerung im Mikroskop photographiert wurden. Die betreffenden Lebern waren zu 8, 13 bzw. 65 % verfettet.

Tabelle 7 zeigt den Anteil der verfetteten Zellen am jeweiligen Präparat in %, einmal bei Berücksichtigung aller im Paraffinschnitt sichtbaren Vakuolen, dann auch unter Ausklammerung der kleintropfigen Verfettungsform. Die dazugehörigen chemischen Werte können aus Tabelle 6 abgelesen werden.

Die in der Praxis übliche kategoriale Einstufung der histologischen Bilder lehnten wir wegen ihrer Ungenauigkeit und Abhängigkeit vom subjektiven Eindruck des Betrachters ab. Ebenso verzichteten wir auf das Punkt-Treff-Verfahren (Schätzung des Flächenanteils der Fetttropfen), welches zwar objektive Werte zu liefern vermag, aber mit technischen und methodischen Schwierigkeiten behaftet ist. Im Vergleich zu den chemischen Triglyceridwerten liegen die mit dem PTV ermittelten Werte zu hoch. Als Ursachen für die Überschätzung kommen hauptsächlich HOLMES-Effekte, d. h. das Durchscheinen opaker Körper im Schnittpräparat, unterschiedliche Schrumpfung von Gewebe und Fetttropfen, Schnittstauchung, Randtreffer u. a. m. in Betracht (KREMER) (31). Auch eine komplizierte rechnerische Korrektur dieser Fehlerquellen kann nicht vollständig befriedigen (THALER) (46). Obwohl die Zellauszählung ihrerseits ebenfalls nicht allen Ansprüchen genügen kann - sie ist sehr zeitraubend und gibt nur über die Häufigkeit verfetteter Leberzellen Auskunft, sagt aber im Grunde nur wenig über den Lipidgehalt aus, der von der Größe der Fetttropfen bestimmt wird -, erwies sie sich doch wegen des Vorteils einfacher Ausführbarkeit und im Vergleich

zum PTV kaum geringerer Genauigkeit (THALER) (46) für unsere Belange verwertbar.

Die Verwendung von Paraffinschnitten zwingt zwar zum Verzicht auf die Mitbeurteilung feinsttropfiger Verfettung, die bei Fettfärbung an Gefrierschnitten möglich wäre, bietet aber dafür eine geringere Streuung von zugeordneten, chemisch bestimmten Lipidwerten (KREMER) (30). Dies wird auf eine Überbewertung der feintropfigen Verfettung durch die zahlreichen feinen, rot gefärbten Tröpfchen im Sudan III-Gefrierschnitt zurückgeführt. Bei ausschließlich feintropfiger Verfettung fand KREMER (30), allerdings in Widerspruch zu anderen Autoren (z. B. BERINGER (3), THALER (46)), maximale Triglyceridwerte von nur 2,6 %, die angesichts des minimalen Triglyceridgehaltes in der normalen Leber von 0,5 % kaum ins Gewicht fallen. Im Paraffinschnitt kommen feinste Tropfen gar nicht zur Darstellung, so daß hier die Möglichkeit der Fehleinschätzung weitaus geringer ist. Weitere Fehlermöglichkeiten im Gefrierschnitt, wie z. B. unterschiedliche Schnittdichte, HOLMES-Effekte und anderes (KREMER) (31) können beim Paraffinschnitt vermieden werden. Darüber hinaus gehört der Paraffinschnitt mit HE-Färbung zu den Routinemethoden der Pathologie, was angesichts der Betonung einfacher Versuchsdurchführbarkeit in unserer Arbeit seine Verwendung endgültig begründete.

Bei der histologischen Untersuchung des vorliegenden Sektionsmaterials fiel auf, daß kaum ein Präparat völlig vakuolenfrei war. Lediglich in drei Fällen wurden keine Vakuolen festgestellt - ihr chemischer Lipidgehalt betrug 3,89, 4,11 bzw. 4,45 %. In allen anderen Fällen variierte der histologische Befund unabhängig vom makroskopischen Aussehen der Leber von 0,04 bis 99,54 % verfetteter Zellen, was einem chemischen Verfettungsgrad von 3,72 - 46,09 % des Feuchtgewichts entsprach.

Das hier sichtbare Problem der Definition der "normalen" und "pathologischen" Verfettung wird in der Literatur nur mit großer Vorsicht behandelt.

Viele Autoren, so zum Beispiel FISCHER (13) und SCHILLER (41) konnten in ihrem Sektionsgut keine Lebern beobachten, in denen es nicht möglich gewesen wäre, Fett histologisch nachzuweisen. Nach SCHILLER (41) schwankt die Menge des mit Sudan III färbereich faßbaren Fettes innerhalb beträchtlicher Grenzen. Feintropfige Verfettungen mittleren Ausmaßes und auch leichtere mittel- und großtropfige Leberverfettung von 10 - 20 % verfetteter Leberzellen werden von WILDHIRT (48) nicht prinzipiell als pathologisch aufgefaßt. Seit KALK (28) ist es üblich, erst eine Verfettung von mehr als 50 % der Leberzellen als das Substrat einer Fettleber aufzufassen. WILDHIRT (48) geht hierbei davon aus, daß die Verfettung in der Regel nur aus dem HE-Präparat mit Vakuolenbildung abgeschätzt wird, feinsttropfige Verfettung also

unberücksichtigt bleibt.

Bezeichnen wir zusammen mit WILDHIRT (48) einen Verfettungsgrad bis zu 10 % verfetteter Zellen als noch im Normbereich liegend - von anderen möglichen Strukturveränderungen natürlich abgesehen - so liegt der Lipidgehalt im 3 - 15 %-Bereich; seine Häufigkeitsverteilung zeigt ein Maximum bei 3 - 6 % (Abb. 7 (a)).

Umgekehrt reicht der Lipidgehalt histologisch stärker verfetteter Präparate von 3 - 48 %. Das Häufigkeitsmaximum liegt bei 12 - 15 % (Abb. 7 (b)).

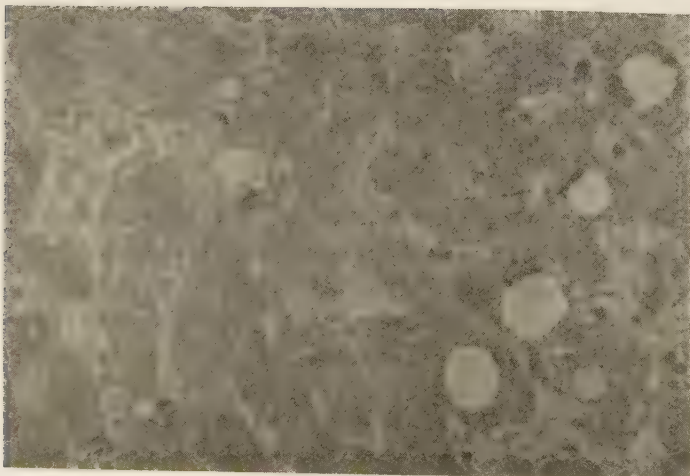
Wie aus den Abbildungen hervorgeht, kommt es im Bereich von 3 - 15 % zur Überschneidung der beiden Kurven. Hier befinden sich ca 50 % der als pathologisch aufgefaßten Proben.

Ähnlich den Verhältnissen beim makroskopischen Befund läßt sich also auch hier keine scharfe Trennung der normalen und pathologischen Klasse erreichen, wenn die chemische Lipidbestimmungsmethode als zuverlässiger Maßstab gewählt wird.

Abbildung 6: Photographisches Bild eines Leber-
präparates mit (a) 8 %, (b) 18 %, (c)
65 % (vgl. Lebernummer 78, 26, 84)
bei 320facher Vergrößerung im
Mikroskop.

Maßstab: entspricht 10 μ

(a)



(b)



(c)

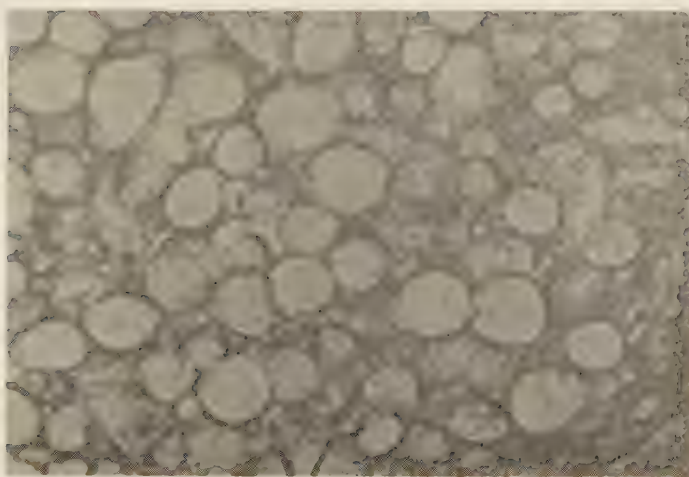


Tabelle 7: Histologischer Verfettungsgrad der Proben
unter Berücksichtigung der kleintropfigen
Verfettungsform

Lebernummer	Histologischer Befund	
	Anteil der ver- fetteten Zellen in % aller Zellen	Anteil der ver- fetteten Zellen mit einem Vakuolendurch- messer $>10\mu$ in % aller Zellen
1	36,4	32,6
2	86,06	78,82
3	30,32	24,56
4	15,38	4
5	82,62	22,9
6	62,36	26,22
7	82,9	19
8	32,8	30,3
9	74,4	65
10	24,18	11,22
11	4,88	0,6
12	6,64	3,2
13	77,34	5,2
14	23,76	3,1
15	33,62	1,2
16	95,76	89
17	0,22	0,1
18	62,12	36,1
19	35,76	36,8
20	2,94	2,62
21	21,04	1,41

Histologischer Befund

Lebernummer	Anteil der verfetteten Zellen in % aller Zellen	Anteil der verfetteten Zellen mit einem Vakuolendurchmesser $>10\ \mu$ in % aller Zellen
22	25,9	16,12
23	19,54	11,76
24	89	81,6
25	12,24	10,88
26	18,8	10,2
27	89,8	79,2
28	0,6	0,4
29	9,32	9,1
30	2,26	1,72
31	0,04	0
32	30,7	3,2
33	76,96	73,2
34	6,54	3,6
35	6,4	5,5
36	42,72	21,1
37	27,88	12,8
38	0,54	0,4
39	41,44	25,02
40	29,8	15,62
41	64,06	59,2
42	1,98	1,58
43	2,34	0,04
44	65,5	37,12
45	76,9	62,3
46	96,24	94,7

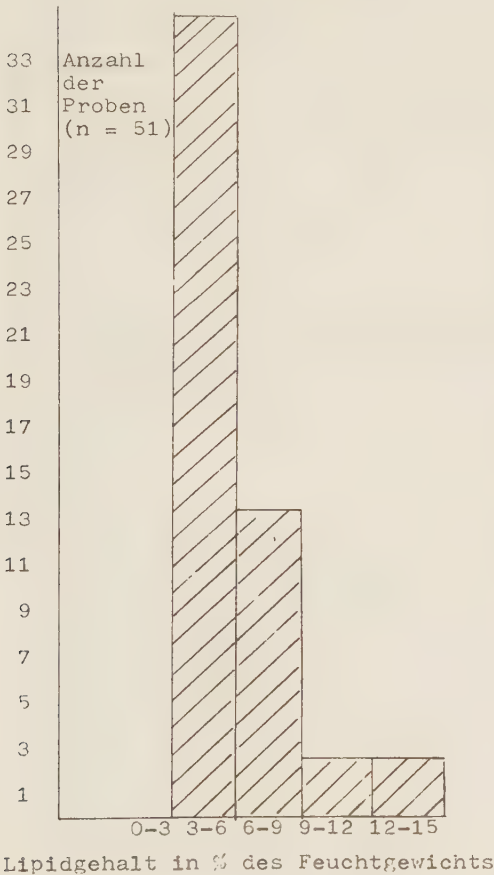
Lebernummer	Histologischer Befund	
	Anteil der verfetteten Zellen in % aller Zellen	Anteil der verfetteten Zellen mit einem Vakuolendurchmesser $>10\mu$ in % aller Zellen
47	27	24,36
48	9,06	7,22
49	26,9	16,4
50	17,06	5,98
51	9,74	4,6
52	83,7	65,8
53	67,2	61,2
54	8,16	1,8
55	81,96	2,5
56	0	0
57	0,73	0,5
58	7,66	3,3
59	29,02	16,7
60	17,2	9,4
61	69,38	17,42
62	14,52	9,52
63	0	0
64	9,6	5,2
65	1,08	0,62
66	4,24	1,8
67	99,54	99,44
68	29,88	24,0
69	33,06	72,4
70	13,06	4,4
71	0,14	0,1
72	22,98	3,9

Lebernummer	Histologischer Befund	
	Anteil der verfetteten Zellen in % aller Zellen	Anteil der verfetteten Zellen mit einem Vakuolendurchmesser $>10\mu$ in % aller Zellen
73	4,88	3,0
74	14,18	10,8
75	38,06	39,2
76	33,78	21,7
77	76,82	60,6
78	8,28	6,2
79	7,42	4,52
80	72,64	14,2
81	72,34	55,8
82	57,14	52
83	3,04	1,4
84	65,04	54,5
85	0,52	0,6
86	0,08	0,06
87	0	0
88	38,8	17,12
89	23,3	6,5
90	4,58	0,26
91	6,38	4
92	6,16	5
93	0,28	0,28
94	26,42	5,7
95	0,9	0,84
96	0,38	0,26
97	40,28	0,66
98	4,72	3,6

Lebernummer	Histologischer Befund	
	Anteil der verfetteten Zellen in % aller Zellen	Anteil der verfetteten Zellen mit einem Vakuolendurchmesser $>10\mu$ in % aller Zellen
99	2,44	0,36
100	1,82	1,2
101	0,4	0,24
102	0,65	0,54
103	0,7	0,08
104	34,76	16,2
105	53,58	18,3
106	0,74	0,16
107	54,34	36,8
108	2,84	0,58
109	3,48	2,26
110	1,18	0,78
111	0,12	0,08
112	2	1,08
113	0,2	0,18
114	3,74	2,32

Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung chemisch ermittelter Lipidwerte in Abhängigkeit vom histologischen Verfettungsgrad

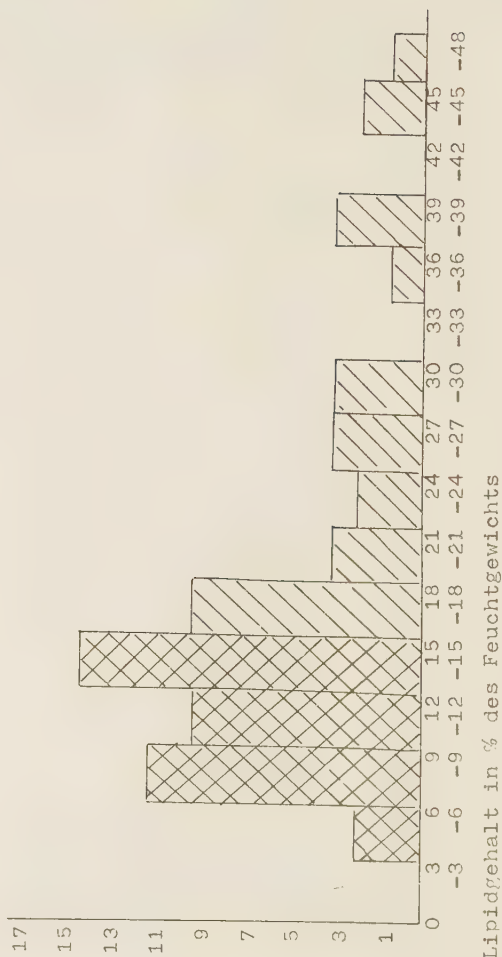
(a) bei einem histologischen Verfettungsgrad bis zu 10 % verfetteter Zellen



(b) bei einem histologischen Verfettungsgrad 10 %
verfetteter Zellen

Anzahl der Proben
(n = 63)

Überschnittsbereich mit
Abbildung 7 (a)



3.5.5. Korrelationsbeziehungen zwischen histologischen und chemischen Ergebnissen

Die Möglichkeit zu einem weitgehenden Vergleich chemischer und histologischer Befunde ermöglicht ihre Korrelationsanalyse. Sie ergibt die Regressionsgrade der Abbildung 7 (a). Der Korrelationskoeffizient ist signifikant ($\alpha = 5\%$) und extrem hoch : $r = 0,83$ (berechnet nach SACHS (40)). Im Einzelfall läßt sich jedoch der entsprechende Lipidwert nicht mit hinreichender Schärfe aus einem Zählwert ablesen, da die den Zählwerten zugeordneten Lipidwerte eine zu breite Streuung aufweisen. Die wichtigste Ursache dafür scheint außer in den Mängeln des Paraffinschnittes in der unter bestimmten Voraussetzungen möglichen histologischen Nichtdarstellbarkeit der Lipide zu liegen. Schon HARTMANN und FLECK (19) wiesen darauf hin, daß für die histologische Nachweisbarkeit des Neutralfettes die Höhe der gleichzeitig anwesenden Phosphatide ausschlaggebende Bedeutung besitzt. Je höher der Phosphatidgehalt ist, umso weniger ist das Neutralfett sichtbar. Vermutlich bestimmen die Phosphatide den chemisch-physikalischen Zustand des Neutralfettes, von dem sein Sichtbarwerden abhängt. Eine histologisch leichte Verfettung kann also durchaus chemisch schwer sein. Andererseits trifft man besonders beim Rückgang einer Leberverfettung Fälle, in denen eine histologisch schwere Verfettung bei chemisch geringer Neutralfettzunahme auftritt. Hier sind die Phosphatide relativ schneller abgesunken als die Neutralfette. Mit quantitativen Aussagen über den Fett-

stoffwechsel der Leber muß man also, wenn man sich nur auf histologisches Material stützt, sehr zurückhaltend sein.

Eine andere Erklärung für die starke Streuung könnte allerdings auch in dem Bezug des Lipidgehaltes auf das Feuchtgewicht der Leber liegen. Obwohl KREMER (31) an zahlreichen Vergleichsuntersuchungen von Leichenleberpunktaten nachweisen konnte, daß bei sorgfältiger Arbeitsweise das Feuchtgewicht ebenso zuverlässig bestimmt werden kann wie das Trockengewicht, seiner Meinung nach also beide Bezugspunkte gleichwertig sind und die Angabe in Prozent des Feuchtgewichts den zusätzlichen Vorteil der besseren Anschaulichkeit besitzt, so kann doch der Einwand, gerade in Leichenlebern weise die Flüssigkeitsmenge von Fall zu Fall erhebliche Schwankungen auf, nicht unberücksichtigt bleiben. Lipidbestimmungen an getrockneten Lebern müssen hier eine Klärung bringen.

Die Streuung läßt sich indessen verringern und der Korrelationskoeffizient signifikant verbessern (Z-Test nach SACHS (40) bei $\alpha = 5\%$), wenn man bei der Korrelationsprüfung lediglich Vakuolen $>10\ \mu\text{m}$ berücksichtigt (Abb. 7 (b)). Der dadurch entstehende Fehler in der Erfassung des Lipidgehaltes ist vergleichsweise gering, wenn man bedenkt, daß der Vakuolenradius bei der Annahme einer kugelförmigen Tröpfchengestalt bei der Volumenbestimmung mit der 3. Potenz in die Rechnung eingeht. Das Volumen eines im Durchmesser $50\ \mu\text{m}$ großen Tropfens ist demnach 125mal größer als das

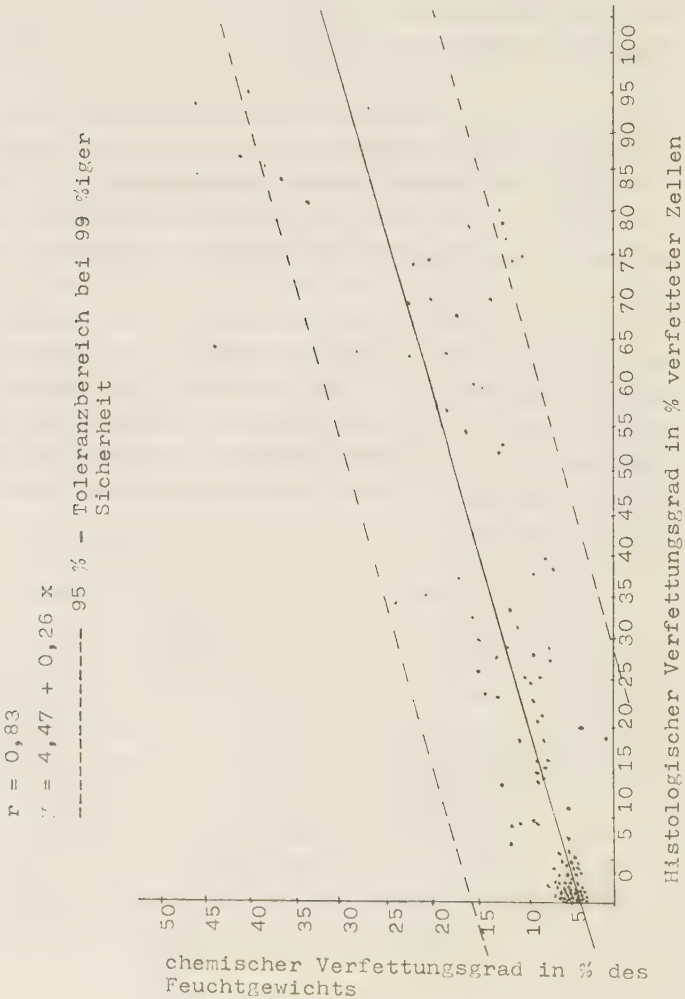
Volumen eines 10 μ m großen Tropfens, dessen Lipidgehalt damit vernachlässigbar klein erscheint. Da bei der Zellauszählung eine große Vakuole aber die gleiche Bedeutung hat wie eine kleine, muß es auf diese Weise zu einer beträchtlichen Verzerrung der histologischen Ergebnisse kommen.

Versucht man die Korrelationsbeziehung noch weiter zu verstärken und den Streubereich einzuengen, indem man die fettcirrhotischen Lebern (insgesamt 9 Präparate) herausläßt, werden der Korrelationskoeffizient (jetzt auch 0,90) nicht und die Streuung nur unwesentlich beeinflußt.

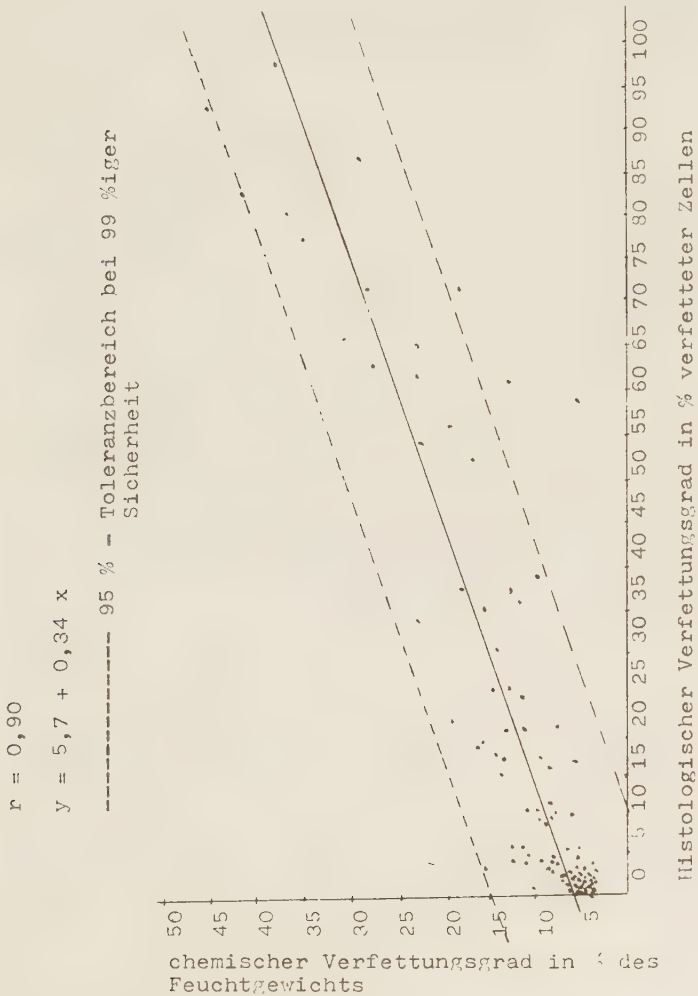
Ähnliche Ergebnisse werden von KREMER (30) angegeben. Danach schwankt der Triglyceridgehalt von Leberpunktionszylindern eines nicht ausgewählten Patientenguts von 0,5 - 24 %. Zwischen dem chemisch und histologisch ermittelten Fettgehalt besteht eine deutliche Korrelation.

Abbildung 8: Korrelationsbeziehung zwischen dem
histologischen und chemischen Befund

(a) bei Berücksichtigung aller verfetteten Zellen



(b) bei Berücksichtigung von verfetteten Zellen mit einem Durchmesser $>10 \mu\text{m}$



4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Leberlipiden vorgestellt, die auf der Extraktion der Lipide mit Chloroform-Methanol beruht.

Es konnte gezeigt werden, daß diese Methode am gleichen Material zu gut reproduzierbaren Ergebnissen führt (VK = 1,5 %) und daß sie im Hinblick auf eine Gesamtlipidbestimmung den Bedingungen der International Organization for Standardization gerecht wird, darüber hinaus aber noch den Vorteil der schnellen und einfachen Durchführbarkeit besitzt: Der zeitliche Aufwand beträgt lediglich 1 1/2 - 2 Stunden.

Ihre Eignung für die qualitative Lipiddarstellung wurde anhand des gaschromatographischen Musters von Fettsäuremethylestern des Lipidextrakts überprüft und in einer Gegenüberstellung mit Literaturangaben für gleichwertig befunden.

In einem Vergleich der chemischen und der makroskopischen bzw. mikroskopischen Beurteilung der Leberverfettung an 114 Leichenlebern aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München stellten wir fest, daß sowohl das makroskopische wie auch das mikroskopische Bild trotz der vorhandenen positiven Korrelation zu chemisch bestimmten Werten nicht immer eine sichere Verfettungsdiagnose und nur

in Grenzen eine quantitative Abstufung des Verfettungsgrades erlauben. Ca 40 % der makroskopisch und ca 50 % der histologisch verfetteten Lebern haben einen Lipidgehalt bis 12 % bzw. bis 15 % des Leberfeuchtgewichts und liegen damit gleichzeitig im Bereich der makroskopisch bzw. histologisch normalen Lebern. Nur die chemische Lipidbestimmung scheint in der Lage zu sein, einen objektiven Verfettungsnachweis zu erbringen und nur mit ihrer Hilfe läßt sich eine obere Verfettungsgrenze festlegen, ab der eine Leberverfettung als pathologisch erscheinen muß. Dies gilt nicht zuletzt für den Fall in Auflösung befindlicher Lebern, wenn sowohl die makroskopischen als auch die histologischen Aussagemöglichkeiten wesentlich eingeschränkt sind.

Obwohl eine verbindliche Verfettungsgradverteilung nach chemischen Ergebnissen noch weiteren Untersuchungen vorbehalten werden muß, schlagen wir vor, einen Lipidgehalt von 6 - 9 % als oberen Normbereich aufzufassen. Dieser Normbereich wird nur von ca 5 % der makroskopisch und histologisch normalen Proben überschritten, umgekehrt liegen ca 10 % der makroskopisch bzw. 5 % der histologisch verfetteten Präparate darüber.

5. Literaturverzeichnis

1. Atkinson, T.,
Flower, V. R.,
Gardon, G. A.,
Lough, A. K.: A Rapid Method for the
Accurate Determination of
Lipid in Animal Tissues.
Analyst 97, 562 (1972)
2. Berg, G.,
Troll, U.,
Hahn, H.,
Elster, K.: Biochemische Analysen der
Leberfette bei Fettleber.
Klinische Wochenschrift 45,
1084 (1967)
3. Behringer, A.,
Hrabal, J.,
Irsigler, K.,
Thaler, H.: Schlußwort zu einer Dis-
kussionsbemerkung von Lange,
H. J., Knick, B., Kößler,
F. K. und Kremer, G. J. zu
"Der Einfluß von Tolbutamid
auf die diabetische Fett-
leber" von Beringer, A. und
Mitautoren. Deutsche Mediz.
Wochenschrift 93, 1414 (1968)
4. Bloor, W. R.: A Method for the Determi-
nation of Fat in Small
Amounts of Blood.
Journal of Biol. Chem. 17,
377 (1914)
5. Boyd, E. M.: Zit. nach Lovern, J. A.
6. Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie,
4. Auflage, Walter de
Gruyter-Verlag, Berlin 1974
7. Chapman, D.: Lipide, 1. Auflage, Hippo-
krata Verlag, Stuttgart 1973

6. Christen, H. R.: Grundlagen der organischen Chemie, 1. Auflage, Verlag Sauerländer Aaran, Diesterweg - Salle, Frankfurt/Main 1970
9. Elster, K.: Zur Morphologie und Pathogenese der Fettleber. Leber Magen Darm 1, 109 (1971)
10. Erickson, B., N.,
Avrin, I.,
Teague, D.,
Williams, H. H.: Micromethods for the Determination of Sphingomyelin and Choline. Journal of Biol. Chemistry 135, 671 (1940)
11. Euffinger, W.: Zit. nach Hauser, R.
12. Falk, H. Über den "Fettinfarkt" der Leber. Zieglers Beiträge zur pathologischen Anatomie und allgemeinen Pathologie 112, 104 (1952)
13. Fischer, W.: Zur Kenntnis der Lokalisation des Fettes in der Leber. Virchows Archiv 208, 1 (1912)
14. Folch, J.,
Ascoli, I.,
Lees, M.,
Meath, J. A.,
Le Baron, F. N.: Preparation of Lipide Extracts from Brain Tissues. Journal of Biological Chemistry 191, 833 (1951)

15. Folch, J.,
Lees, M.,
Sloane Stanley, G. M.: A simple Method for the
Isolation and Purification
of Total Lipides from
Animal Tissues.
Journal of Biological
Chemistry 226, 497 (1957)
16. Gnauck, G.,
Stolz, P.,
Honigmann, G.,
Singer, P.: Die gaschromatographische
Analyse der Lipid-Fett-
säuren in Serum und
Organgewebe.
Zeitschrift für medizinische
Labortechnik 14, 15 (1973)
17. Hadorn, H.: Zit. nach Maier, H. G.:
Lebensmittelanalytik, Bd. II,
2. Auflage, Verlag Stein-
kopff-UTB, Darmstadt 1977
18. Hallermayer, R.: Eine Schnellmethode zur
Bestimmung des Fettgehalts
in Lebensmitteln.
Deutsche Lebensmittel-Rund-
schau 72, 356 (1976)
19. Hartmann, R.,
Fleck, H.: Vergleichende chemische
und histologische Analyse
der Leberverfettung.
Klinische Wochenschrift 30,
652 (1952)
20. Hauser, R.: Leber. In: Hencke, F.,
Lubarsch, O.: Handbuch der
speziellen pathologischen
Anatomie und Histologie,
Bd. V/1, 1. Auflage, Verlag
von Julius Springer, Berlin
1930
21. Hamperl, H.: Zit. nach Falk, H.

22. Haven, F. L., Zit. nach Lovern, J. A.
 Levy, S. R.:
23. Hecker, E.: Verteilungsverfahren im
 Laboratorium, 1. Auflage.
 Verlag Chemie GmbH, Wein-
 heim 1955
24. Helly, K.: Über septische Leberflecken.
 Verhandlungen der Deutschen
 Pathologie-Gesellschaft 13,
 312 (1909)
25. Helly, K.: Fettgehalt und Fettphanerose.
 Zieglers Beiträge zur pathol.
 Anat. und allgem. Pathologie
 60, 1 (1914)
26. Holczabek, W.: Dünnschichtchromatographische
 Lipiduntersuchungen bei
 Fäulnis.
 Wiener Beiträge zur gerich-
 tlichen Medizin 25, 304 (1969)
27. International Meat and Meat products-
 Standard 1443: Determination of total fat
 content, 1. Auflage.
 International Organization
 for Standardization, Schweiz
 1973
28. Kalk, H.: Über die Fettleber.
 Münchener Medizinische
 Wochenschrift 107, 1141
 (1965)
29. Kettler, L. H.: Parenchymschädigungen der
 Leber. Ergebnisse der all-
 gem. Path. und path.
 Anatomie 37 (1954)

30. Kremer, G. J.,
KöBling, F. K.,
Lange, H. J.,
Victor, N.:
Chemische und histologische
Untersuchungen an 150 Leber-
punktaten.
Deutsche Medizin. Wochen-
schrift 94, 163 (1969)
31. Kremer, G. J.,
KöBling, F. K.,
Lange, H. J.,
Victor, N.:
Möglichkeiten und Grenzen
des Punkt-Treff-Verfahrens
zur Best. des Fettgehaltes
im biopt. Leberschnitt-
präparat.
Klinische Wochenschrift 47,
896 (1969)
32. Kremer, G. J.,
Katzenbach, G.,
Mevissen, H.,
Hegner, J.,
Netter, P.:
Zur regionalen Verteilung
des Triglycerid- und Phos-
pholipidgehaltes in nor-
malen und verfetteten mensch-
lichen Lebern.
Leber Magen Darm 1, 125 (1971)
33. Kumagawa, M.,
Suto, K.:
Ein neues Verfahren zur
quantitativen Bestimmung
des Fettes und der unver-
seifbaren Substanzen in tie-
rischem Material nebst der
Kritik einiger gebräuchlicher
Methoden.
Biochem. Zeitschrift 8,
212 (1908)
34. Lapp, H.:
Morphologie der Fettleber.
Medizin und Ernährung 5,
49 (1964)
35. Lovern, I. A.:
Preparation and Analysis of
Lipids. In: The Chemistry
of Lipids of Biochemical
Significance. Methuen & Co.
LTD, London 1954

36. MacKibbin, J. H.,
Taylor, W. E.: The Mitrogenous Constituents
of the Tissues Lipides.
Journal of Biol. Chemistry
178, 17 (1949)
37. MacClean, H.: Zit. nach Loverr.
38. Müller, K.: Laparoskopische Aspekte
der Fettleber.
Leber Magen Darm 1, 111 (1971)
39. Radke, M.,
Schäfer, M.,
Kruse-Jarres, J. D.: Gaschromatogr. Bestimmung
von Lipiden in Blut, Plasma
oder in Organgeweben.
Zeitschrift für klin. Chemie
und klin. Biochemie 13,
231 (1975)
40. Sachs. L.: Statistische Auswertungs-
methoden, 2. Auflage.
Springer Verlag, Berlin 1969
41. Schiller, E.: Über den Fettgehalt der
Leber beim gesunden Men-
schen.
Zeitschrift für mikrosk.-
anat. Forschung 51, 309
(1942)
42. Schön, H.,
Krause, K.,
Elster, K.: Das Fettsäuremuster der
menschl. Leber im Zustand
der Verfettung.
Klin. Wochenschrift 41,
743 (1963)
43. Schön, H.,
Strunk, K.,
Hennig, N.: Das Fettsäuremuster der
menschlichen Leber.
Medizin und Ernährung 6,
27 (1965)

44. Sinclair, R. G.: The Lecithin, Cephalin, and Sphingomyelin Content of Serum.
Journal of Biological Chemistry 174, 343 (1948)
45. Singer, P.,
Gnauck, C.,
Honigsmann, G.,
Stolz, P.,
Schliack, V.,
Kettler, L. M.,
Buntrock, P.,
Thoelke, H.: The Fatty Acid Pattern of Adipose Tissue and Liver Triglycerides According to Fat Droplet Size in Liver Parenchymal Cells of Diabetic Subjects.
Diabetologia 10, 455 (1974)
46. Thaler, H.: Leberzellverfettung und Fettleber aus morphol. Sicht.
Leber Magen Darm 1, 105 (1971)
47. Thannhauser, S. J.
Setz, P.: Studies of Animal Lipids.
Journal of biological Chemistry 116, 533 (1936)
48. Wildhirt, E.: Über die Häufigkeit der Fettleber aus klin. Sicht.
In: Fettstoffwechsel 3 - Europäisches Symposium an der Medizin. Klinik mit Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg in Erlangen (17./18.3.1967)

Herrn Prof. Dr. E. Liebhardt danke ich
für die Überlassung des Themas. Frau
Dr. C. Baur und Herrn Dr. G. Drasch
danke ich für ihre Anregungen bei der
Arbeit.

Lebenslauf

Am 7. Mai 1952 wurde ich in Breslau/Schlesien als zweites Kind der Eheleute Ludmilla und Heinrich Alfred geboren. Von 1959 bis 1966 besuchte ich die ersten 7 Klassen der Volksschule Nr. 70 in Breslau. Nach der Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1966 trat ich in die 7. Klasse der Volksschule an der Hirschbergstraße in München ein. Ein Jahr später wechselte ich in die Rudolf - Diesel - Realschule über. Nach bestandener Mittlerer Reife wurde ich in die 11. Klasse des Theresiengymnasiums aufgenommen, wo ich 1973 meine Schullaufbahn mit dem Abitur beschloß. Im Winter - semester desselben Jahres begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig - Maximilians - Universität. Im Sommer 1975 legte ich die Ärztliche Vorprüfung und im Winter 1979 die Ärztliche Prüfung ab.

